

University of Groningen

Cellular adhesion to and detachment from solid substrata studied in a parallel plate flow chamber

Kooten, Theo Gerrit van

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
1993

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Kooten, T. G. V. (1993). Cellular adhesion to and detachment from solid substrata studied in a parallel plate flow chamber. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

HOOFDSTUK 14

SAMENVATTING

Biomaterialen zijn gedefinieerd als "niet-levensvatbare materialen gebruikt in een medische toepassing en bedoeld om interactie aan te gaan met biologische systemen". Ze worden gebruikt voor vervanging van slecht functionerende of verloren gegane lichaamsdelen. Er bestaat een grote variëteit aan materialen met verschillende eigenschappen van zowel het binnengedeelte als het oppervlak. De eigenschappen van het oppervlak omvatten onder andere ruwheid, lading en bevochtigbaarheid, ook wel hydrofobiciteit genoemd. Een druppel water zal op een zeer goed bevochtigbaar (hydrofiel) materiaal als glas volledig uitspreiden en een lage contact hoek geven tussen het raakvlak aan de druppel en het materiaal oppervlak. Op een waterafstotend (hydrofoob) materiaal als Teflon zal die druppel niet spreiden en een grote contact hoek geven. Oppervlakken van biomaterialen gaan een interactie aan met eiwitten en cellen die aanwezig zijn in de bloedbaan, het weefselvocht en de weefsels die in contact staan met het biomateriaal. Deze zogenoemde cel-materiaal ofwel cel-substraat interacties vormen een wezenlijk aspect van de biocompatibiliteit van biomaterialen. Het begrip biocompatibiliteit is gedefinieerd als "het vermogen van een materiaal om te functioneren in een specifieke toepassing, waarbij het lichaam een passend antwoord op de aanwezigheid van het biomateriaal genereert". Cel-substraat interacties zijn veelal bestudeerd onder statische omstandigheden zonder de aanwezigheid van krachten zoals die bijvoorbeeld veroorzaakt worden door stromende vloeistof. In het lichaam zijn die krachten echter wel aanwezig, hetgeen duidelijk is voor vaatprothesen waar het bloed doorheen stroomt. Maar ook heup prothesen, kaak implantaten en buikwand prothesen zijn aan krachten blootgesteld. Om deze situaties beter te benaderen, zijn in recentere studies (zie ook dit proefschrift) cellen gehecht aan vaste oppervlakken blootgesteld aan zogenoemde afschuifkrachten, die meestal door stromende vloeistof worden gegenereerd. Deze afschuifkrachten zijn evenwijdig aan het substraat in de richting van de stroming gericht en werken op het substraat geprojecteerde oppervlak van de cel.

De doelstellingen van dit proefschrift, zoals ze beschreven worden in **Hoofdstuk 1**, zijn het ontwikkelen van een systeem waarin cellen gehecht aan een vast oppervlak blootgesteld kunnen worden aan afschuifkrachten en continu geobserveerd kunnen worden met behulp van beeld analyse technieken; het geven van een zowel kwalitatieve als kwantitatieve beschrijving van celgedrag tijdens blootstelling aan afschuifkrachten en het bepalen van de invloed van de bevochtigbaarheid van oppervlakken op dit celgedrag.

In **Hoofdstuk 2** wordt een literatuur overzicht gegeven over enkele aspecten van cel-substraat interacties. Besproken worden onder meer de hierbij betrokken cel structuren, de rol van de verschillende oppervlakte eigenschappen en de rol van eiwit adsorptie. Er wordt ook een korte beschrijving gegeven van een aantal apparaten waarmee afschuifkrachten gegenereerd kunnen worden, terwijl een uitgebreidere beschrijving van de parallelle plaat stroomkamer is gegeven, omdat deze in de vermelde studies gebruikt is. Tenslotte wordt een balans gepresenteerd van de krachten die op een cel werken tijdens blootstelling aan een vloeistofstroom in de parallelle plaat stroomkamer. In **Hoofdstuk 3** worden de in dit proefschrift gebruikte methoden samengevat.

In **Hoofdstuk 4** wordt de parallelle plaat stroomkamer beschreven en worden de voorwaarden weergegeven voor een laminair (gelaagd) stroom profiel, welke het berekenen van afschuifkrachten mogelijk maakt. De stroomkamer is gebruikt om het loslaten van humane bindweefsel cellen (fibroblasten) van een hydrofiel glas oppervlak te bestuderen. Voordat het mogelijk is om individuele cellen in de tijd te volgen, is het noodzakelijk om de celranden met behulp van een computermuis te markeren om zodoende de cellen automatisch van het kale glas oppervlak te kunnen onderscheiden. Verdere analyse van cel oppervlak, vorm en aantal gehechte cellen kan dan automatisch plaats vinden via programmatuur. Fibroblasten gehecht op glas werden blootgesteld aan stapsgewijs oplopende afschuifkrachten, waarbij de kracht waarbij 50% van de cellen los had gelaten bepaald werd. Dit was het geval bij 352 dynes/cm². Ter vergelijking: In een arterieel menselijk bloedvat is de gemiddelde afschuifkracht 20 dynes/cm², in een veneus bloedvat 2 dynes/cm². Het loslaten van de cellen begon pas boven een bepaalde afschuifkracht op te treden en werd vergezeld door het afronden van cellen. Scanning electronen microscopie toonde aan dat bij dit afronden de cel zich terugtrok via een netwerk van draad-achtig celmateriaal. Deze netwerken waren niet meer op het glas oppervlak aanwezig na los laten van de cel.

In de **Hoofdstukken 5 en 6** wordt het loslaten van cellen beschreven van hydrofoob FEP-Teflon. De resultaten worden vergeleken met die van glas. Het grootste deel van de cellen op FEP was niet gespreid en liet ook direct los na blootstelling aan afschuifkrachten van maar 20 dynes/cm². Goed gespreide cellen echter trokken zich binnen een minuut terug, rondten af en verlieten het oppervlak. Dit proces ging gepaard met de tijdelijke aanwezigheid van draad-achtige netwerken zoals die ook op glas waren waargenomen, hoewel vertakkingspatronen alsmede dichtheid van het netwerk niet vergeleken waren met die op glas. De resultaten geven aan dat terughoudendheid geboden is bij het interpreteren van interacties van cellen met hydrofobe oppervlakken, zeker als de cel-substraat grensvlakken blootgesteld worden aan het lucht-water grensvlak, welke aanleiding kan geven tot onverwachte, hoge extra krachten (**Hoofdstuk 5**). De verschillende reacties van cellen gehecht aan een hydrofoob en een hydrofiel oppervlak suggereren dat cellen de substraat eigenschappen als het ware "voelen" (**Hoofdstuk 6**).

In **Hoofdstuk 7** wordt beschreven hoe fibroblasten gehecht aan het matig hydrofobe polymethylmethacrylaat (PMMA) en weefselkweek polystyreen (TCPS) reageren

op stapsgewijs verhoogde afschuifkrachten. Over het algemeen neemt de sterkte van cel hechting toe met toenemende bevochtigbaarheid van het substraat, zoals door de afschuifkracht is bepaald waarbij 50% van de cellen heeft losgelaten. Cellen hechtten sterker op TCPS dan op glas terwijl TCPS relatief hydrofober is dan glas. Dit geeft aan dat naast substraat bevochtigbaarheid ook andere factoren een rol spelen zoals de oppervlakte chemie.

In **Hoofdstuk 8** wordt nader bekeken wat de aard is van de cel reactie op de aanwezigheid van afschuifkrachten. Cellen gehecht aan hydrofiel glas en hydrofoob FEP-Teflon werden gefixeerd voordat ze aan de vloeistofstroom werden blootgesteld. De gefixeerde cellen op glas vertoonden geen enkele verandering in aantallen of morfologie, zelfs niet na blootstelling aan lucht-water grensvlakken. Blijkbaar blijven gespreide cellen op het oppervlak indien ze niet in staat zijn actief te reageren. Ook gespreide cellen op FEP-Teflon vertoonden geen veranderingen. Een deel van de niet gespreide cellen liet echter los van het oppervlak boven een afschuifkracht van 328 dynes/cm². Deze waarde is veel hoger dan die gevonden was voor levende cellen (zie Hoofdstuk 5). Hoewel niet bewijzend, versterken de resultaten de mening dat de cel reactie beschreven in de Hoofdstukken 4 t/m 7 actief van aard is en dat gespreide cellen alleen los kunnen laten door dit actieve gedrag.

In **Hoofdstuk 9** wordt de reactie beschreven van endotheel cellen van menselijke navelstreng venen en volwassen menselijke grote been venen, gehecht op glas, op blootstelling aan verschillende afschuifkrachten in de parallelle plaat stroomkamer. De invloed van de hechtingstijd op het aantal gehechte cellen (cel retentie) na 2 uur blootstelling aan afschuifkrachten werd bestudeerd. Ook de effecten op morfologie en migratie werden bestudeerd. In de kliniek is het bedekken van de binnenkant van vaatprotheses met endotheelcellen van belang om een oppervlak te genereren dat bloedstolling tegengaat. In deze klinische situatie is er niet veel tijd om de prothese te bedekken met cellen die over het algemeen geoogst worden uit de grote been venen van de patiënt zelf. Cel retentie na 2 uren blootstelling aan afschuifkrachten variërend van 88 tot 264 dynes/cm² nam af van 85% naar 20%. Hechtingstijden van 3 en 24 uur gaven geen aanleiding tot verschillen in cel retentie of morfologie, hetgeen erop wijst dat na 3 uur de sterkte van de hechting op glas niet meer wezenlijk verandert. De migratie snelheid van de cellen na 24 uur hechting was in vrijwel alle gevallen hoger dan die van cellen na 3 uur hechting. Dit kan een gevolg zijn van veranderingen in cel-substraat interacties die plaatsvinden in de periode tussen 3 en 24 uur. Migrerende cellen lieten op het substraat fibril-achtige sporen achter, hetgeen aangeeft dat breuk in cel structuren optreedt tijdens migratie.

In **Hoofdstuk 10** wordt de reactie beschreven van endotheel cellen van navelstreng venen, uitgezaaid gedurende 3 en 24 uren op polystyreen (PS), weefselkweek polystyreen (TCPS) en een gewijzigd polystyreen met een vergelijkbare bevochtigbaarheid en oppervlakte chemie als TCPS, tijdens blootstelling aan verschillende vaste afschuifkrachten. Het doel was om meer inzicht te krijgen in de invloed van zuurstof, ingemetseld in het oppervlak van polystyreen, op cel retentie, morfologie en migratie. Cel retentie na 150 minuten blootstelling aan afschuifkrachten op TCPS en

gemodificeerd PS was veel hoger dan op normaal PS. Hechtingstijden van 3 en 24 uur gaven gelijke retenties, maar bij afschuifkrachten van 88 en 176 dynes/cm² gaven deze tijden wel verschillen in morfologie en migratie snelheid van cellen gehecht aan TCPS. Net als op glas kan dit ook op TCPS een gevolg zijn van veranderingen in cel-substraat interacties die plaatsvinden in de periode tussen 3 en 24 uur. De fibril-achtige structuren achter gelaten door migrerende cellen werden ook op TCPS en gemodificeerd PS waargenomen.

In **Hoofdstuk 11** wordt beschreven hoe fibroblasten gehecht aan glas reageren op pulserende vloeistof stroom gegenereerd door een met een blok golf aangestuurde pomp. De pulsaties dienden om de klinische situatie zoals die aanwezig is in bijvoorbeeld bloedvat protheses beter te imiteren. De reactie van de cellen werd vergeleken met die van cellen blootgesteld aan de afschuifkrachten welke deel uitmaakten van de blok golf. Dit gebeurde zowel in de aan- als afwezigheid van damping van variaties in de pomp efficiëntie. De resultaten geven aan dat het aantal cellen dat loslaat per tijdseenheid (loslaat snelheid) tijdens blootstelling aan de pulserende stroom, ligt tussen de loslaat snelheden van cellen blootgesteld aan de afzonderlijke componenten van de door de blok golf gegenereerde vloeistof stroom. Verder gaven de pulsaties aanleiding tot uitgerekte celvormen in de richting van de stroom en tot de vorming van een extensief netwerk van draad-achtige structuren. Het bleek dat de variaties in de pomp efficiëntie ook hiertoe aanleiding gaven bij de component met de grote afschuifkracht. Het was opvallend dat zonder de aanwezigheid van deze variaties blootstelling aan de grote afschuifkracht resulteerde in afronding van de cellen tot bolvormige objecten. De conclusie was dat de cel reactie op de door de 0.5 Hz blok golf gegenereerde pulsaties verdeeld kon worden in een duwende beweging in de richting van de stroom als gevolg van de hoge afschuifkracht en een daarop volgende relaxatie bij de lage afschuifkracht.

Tenslotte wordt in de *General Discussion* in **Hoofdstuk 12** het gebruik van de beeldanalyse op een relatief klein microscopisch veld, gedurende een bepaalde tijds periode, besproken en vergeleken met andere methoden die gebruikt worden om cel-substraat interacties te bestuderen. Ook wordt een hypothetisch mechanisme voor het loslaten van cellen gepresenteerd voor een hydrofiel en een hydrofoob substraat, waarbij rekening is gehouden met de waarnemingen beschreven in dit proefschrift en met eiwit adsorptie verschijnselen beschreven in de literatuur. Een aantal suggesties voor toekomstig onderzoek besluiten dit hoofdstuk.

De uiteindelijke conclusie van dit proefschrift is dat het blootstellen van cellen aan afschuifkrachten in een parallelle plaat stroomkamer een waardevolle methode is om cel-substraat interacties te evalueren en dat beeld analyse technieken de gedetailleerde studie van de individuele cel reacties gemakkelijker maken. De methode biedt de mogelijkheid om verder onderscheid aan te brengen tussen materialen met betrekking tot de sterkte van de cel-substraat interacties, hetgeen bijzonder nuttig is indien deze materialen aanleiding geven tot een vergelijkbare cel morfologie onder statische omstandigheden.